

梨花柱半离体培养法及品种自交不亲和基因型鉴定

张绍铃¹ 周建涛¹ 徐义流¹ 陈迪新¹ 徐国华¹ 吴桂法²(¹ 南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ² 高邮市果树实验场, 高邮 225600)

摘 要: 切取梨授粉花柱进行半离体培养的结果表明, 杂交不亲和性组合从花柱基部长出花粉管的花柱比率为 0 ~ 32.4%, 且大多在 16% 以下, 而杂交亲和性组合为 51.6% ~ 86.7%, 与田间杂交授粉的坐果率相近, 且在授粉花粉的萌发率达 20% 以上时, 温室水培枝条促成的花与露地开花的花之间没有显著差异。应用此方法鉴定出了梨品种‘筑水’、‘喜水’及‘爱甘水’的 *S* 基因型分别为 S_3S_4 、 S_4S_5 及 S_4S_5 。

关键词: 梨; 杂交不亲和; 杂交亲和; 半离体培养法; 基因型

中图分类号: S 661.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0703-04

1 目的、材料与方法

梨 (*Pyrus*) 属于配子体型自交不亲和性果树, 其自交不亲和性是由单个基因座的复等位基因 (*S* 基因) 控制的, 在梨树上已经鉴定出 $S_1 \sim S_7$ 的 7 个 *S* 等位基因^[1,2]。梨树不仅自花授粉不结实, 而且存在品种间异花授粉不亲和的现象, 这是由于具有相同 *S* 基因型的品种间相互授粉时, 花柱内 *S* 基因表达的 *S* 糖蛋白能够特异性地抑制与自己具有相同 *S* 基因型的花粉管的生长, 从而无法完成受精^[3,4]。因此, 如果能快速鉴定梨品种的 *S* 基因型, 依据不同 *S* 基因型的品种间授粉能结实, 而相同 *S* 基因型间授粉不能结实的原理, 来选择授粉品种将更为合理。但迄今我国梨、苹果等配子体型自交不亲和性果树中 *S* 基因型被确定的品种尚未见报道。因此我们开展了梨品种 *S* 基因型鉴定方法的研究, 发明了室内授粉花柱半离体培养法, 并首次应用该方法开展了梨品种 *S* 基因型的鉴定研究。

以日本梨 (*Pyrus pyrifolia* Nakai) 已知 *S* 基因型品种及几个拟鉴定 *S* 基因型的品种为试材 (表 3、表 4)。样品分别采自江苏省高邮市果树实验场及南京农业大学梨品种园的幼果期树及高接大树, 于 2002 年 2 月 20 日剪取带花芽的梨树枝条置于温室内水培, 促其提早开花, 3 月 25 日至 4 月 2 日采取露地梨园自然状态下开花的花。授粉用的花粉采自开花前一天的花蕾, 采集花药用透明光面纸包好放入干燥器内使其开药、散粉。花粉萌发率采用固体培养基 (10% 蔗糖, 0.01% 硼酸及 1% 琼脂) 培养 24 h 后用 0.1% 苯胺蓝染色, 在显微镜下进行检测。每个处理检测花粉 100 粒左右, 重复 3 次。

花柱半离体培养: 在培养基 (同前) 上放置一张用酒精洗涤过的滤纸 (7.0 cm × 0.2 cm), 将授粉后的花柱平于房上端切下, 迅速在培养皿中排好, 柱头枕于滤纸上, 并使花柱切口端接触培养基 (图 1)。每个授粉组合处理花柱 10 根左右, 重复 3 次, 在 25℃、黑暗条件下培养 48 h 后, 在花柱切口附近滴上数滴 0.1% 的苯胺蓝, 在显微镜下观察统计从花柱基部长出的花粉管数及长出花粉管的花柱比率 (长出花粉管的花柱数/供试花柱数 × 100%)。

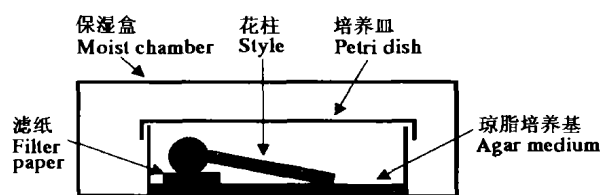


图 1 授粉花柱半离体培养法示意图

Fig. 1 Schematic diagram showing semi vitro culture of pollinated styles

收稿日期: 2003-04-18; 修回日期: 2003-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170651); 高校博士学科点专项科研基金项目 (20010307012); 江苏省自然科学基金项目 (BK2001062); 江苏省高技术研究计划项目 (BG2002309)

2 结果与讨论

2.1 花柱内花粉管生长与花的来源及花粉萌发率的关系

表 1 表明, 花粉萌发率约为 20% 以上时, 从花柱基部长出花粉管的花柱比率没有显著差异。因此, 萌发率在 20% 以上的花粉即可用于授粉试验。

表 1 授粉花粉的萌发率与花柱内花粉管生长的关系

Table 1 The relationship between pollen germination and pollen tube growth in style

杂交亲和性 Cross- compatibility	杂交组合 Cross combination	花粉粒 Pollen grains			花柱 Styles		
		调查数 Tested	萌发数 Germinated	萌发率 Rate(%)	调查数 Tested	长出花粉管的花柱数 With pollen tubes through their bottoms	比率 Rate(%)
不亲和 Incompatible	二十世纪 × 菊水	301	35	11.6	29	6	20.7 ± 3.2
	Nijisseiki × Kikusui	300	67	22.3	30	9	30.0 ± 4.1
		301	170	56.4	30	10	31.3 ± 4.7
亲和 Compatible	爱宕 × 八幸	300	44	14.6	38	18	47.4 ± 5.3
	Atago × Hakko	301	126	41.8	32	24	75.0 ± 5.6
		300	135	45.0	32	26	81.3 ± 4.9

注: 检测当年及经 1~2 年贮藏后的花粉的萌发率, 选择具有不同萌发率的花粉进行授粉。

Note: To test the percentage of pollen germination with fresh pollen grains or those after being stored for one to two years to choose pollen grains with different germination rate for pollination.

水培花枝的花与露地自然开花的花授粉后从基部长出花粉管的花柱比率在相同的杂交组合间没有显著的差异(表 2), 因此, 在进行杂交授粉花柱半离体培养时, 可以用光照培养箱或温室水培花枝的方法, 促其提早开花, 延长采样时期。

2.2 不同杂交授粉组合花柱内花粉管生长的差异

花柱半离体培养的结果表明, 含有相同 S 基因型的品种间杂交授粉表现为杂交不亲和, 从每根花柱基部长出的花粉管数及长出花粉管的花柱比率分别为 0~0.58 条和 0~32.4%, 而且大多在 16% 以下; 而杂交亲和组合分别为 1.7~11.6 条和 51.6%~86.7%, 均显著高于前者(表 3)。由于从花柱基部长出花粉管的花柱比率与田间人工授粉坐果率高低相吻合, 该比率可作为杂交亲和性程度的指标。在本试验中尚未出现从花柱基部长出花粉管的花柱比率介于 32%~52% 的组合, 在实际应用中若出现这种介于二者之间的组合时, 可以通过田间授粉试验结果或 DNA 指纹法来进一步验证。

在杂交不亲和组合中正反交间存在一定的差异, 如‘新水’×‘幸水’的组合, 从花柱基部长出花粉管的花柱比率为 5.6%, 而反交时其比率为 9.4%。产生这种差异可能是由于各品种花柱内 S 糖蛋白量不同^[5]造成的。不过由于杂交不亲和组合中其比率均较小(表 3), 因此, 不影响应用此方法鉴定梨品种 S 基因型的准确性。

2.3 几个梨品种 S 基因型的鉴定

本研究采用已知 S 基因型品种与待测品种授粉后切取花柱半离体培养的方法, 确定了‘筑水’、‘喜水’及‘爱甘水’的 S 基因型分别为 S₃S₄、S₄S₅ 及 S₄S₅ (表 4)。

表 2 露地与水培梨花枝的花授粉后花柱内花粉管生长的差异

Table 2 The differences of pollen tube growth in styles between pollinated flowers from field and room water

杂交组合 Cross-combination	cultured flowering woods (%)			
	花粉萌发率 Pollen germination		长出花粉管的花柱比率 Percentage	
	露地 Field	水培 Water cultured	露地 Field	水培 Water cultured
幸水 × 八幸 Kohsui × Hakko	45.0	41.8	13.3 ± 4.4	11.6 ± 3.8
新水 × 八幸 Shinsui × Hakko	48.9	40.6	6.3 ± 3.2	5.7 ± 3.6
爱宕 × 八幸 Atago × Hakko	45.0	41.8	81.5 ± 4.9	75.0 ± 5.6
长十郎 × 八幸 Chojuro × Hakko	48.8	40.6	64.9 ± 6.4	58.9 ± 7.4

表 3 杂交不亲和及杂交亲和性组合花柱内花粉管生长状况

Table 3 Pollen tube growth state in styles of cross-incompatible and cross-compatible combination

杂交亲和性 Cross-compatibility	品种及 S 基因型 Cultivars and their S-genotypes	调查的花柱数 No. of tested styles	长出花粉管的花柱 Styles with pollen tubes through their bottoms		从花柱切口长出的花粉管数 No. of pollen tubes protruding from style cut	平均每根花柱的花粉管数 Average number of pollen tubes per style
			花柱数 No.	比率 %		
不亲和 Incompatible	长十郎(S ₂ S ₃) × 青龙(S ₂ S ₃) Chojuro × Seiryu	32	0	0	0	0
	新水(S ₄ S ₅) × 幸水(S ₄ S ₅) Shinsui × Kohsui	35	2	5.6 ± 3.7	3	0.08 ± 0.6
	新水(S ₄ S ₅) × 八幸(S ₄ S ₅) Shinsui × Hakko	33	2	6.1 ± 3.7	4	0.12 ± 0.09
	八幸(S ₄ S ₅) × 幸水(S ₄ S ₅) Hakko × Shinsui	31	2	6.5 ± 4.0	4	0.13 ± 0.09
	秀玉(S ₄ S ₅) × 八幸(S ₄ S ₅) Shugyoku × Hakko	32	3	9.4 ± 4.5	6	0.22 ± 0.13
	幸水(S ₄ S ₅) × 新水(S ₄ S ₅) Kohsui × Shinsui	64	6	9.4 ± 4.2	12	0.19 ± 0.06
	菊水(S ₂ S ₄) × 六月(S ₂ S ₄) Kikusui × Rokugatsu	32	3	9.4 ± 6.8	4	0.13 ± 0.07
	幸水(S ₂ S ₄) × 八幸(S ₂ S ₄) Kohsui × Hakko	37	5	13.5 ± 6.4	7	0.18 ± 0.09
	菊水(S ₂ S ₄) × 二十世纪(S ₂ S ₄) Kikusui × Nijisseiki	29	4	13.8 ± 4.2	4	0.14 ± 0.07
	二十世纪(S ₂ S ₄) × 六月(S ₂ S ₄) Nijisseiki × Rokugatsu	34	5	14.7 ± 3.7	5	0.15 ± 0.06
	二十世纪(S ₂ S ₄) × 祇园(S ₂ S ₄) Nijisseiki × Gion	32	5	15.6 ± 5.0	7	0.22 ± 0.10
	菊水(S ₂ S ₄) × 祇园(S ₂ S ₄) Kikusui × Gion	31	5	16.1 ± 8.0	5	0.16 ± 0.06
	金二十世纪(S ₂ S ₄) × 菊水(S ₂ S ₄) Gold Nijisseiki × Kikusui	31	11	32.4 ± 6.5	18	0.58 ± 0.18
	长十郎(S ₂ S ₃) × 菊水(S ₂ S ₄) Chojuro × Kikusui	31	16	51.6 ± 4.1	52	1.68 ± 0.49
	长十郎(S ₂ S ₃) × 八幸(S ₄ S ₅) Chojuro × Hakko	90	53	58.9 ± 7.4	618	9.87 ± 1.72
亲和 Compatible	幸水(S ₄ S ₅) × 丰水(S ₃ S ₅) Kohsui × Holsui	32	23	64.7 ± 8.1	102	3.00 ± 0.57
	菊水(S ₂ S ₄) × 八幸(S ₄ S ₅) Kikusui × Hakko	34	22	80.1 ± 5.6	236	7.61 ± 1.35
	八幸(S ₄ S ₅) × 丰水(S ₃ S ₅) Hakko × Holsui	27	22	81.5 ± 6.1	123	4.56 ± 0.73
	爱宕(S ₂ S ₅) × 八幸(S ₄ S ₅) Atago × Hakko	65	53	81.5 ± 4.9	433	6.66 ± 0.91
	菊水(S ₂ S ₄) × 晚三吉(S ₅ S ₇) Kikusui × Okusankitsu	35	29	82.9 ± 6.8	184	5.26 ± 0.42
	菊水(S ₂ S ₄) × 丰水(S ₃ S ₅) Kikusui × Holsui	30	26	86.7 ± 3.4	349	11.63 ± 2.10

表 4 授粉花柱半离体培养法鉴定梨品种的 S 基因型

Table 4 Identification of pear S-genotypes with the method of semi vitro culturing pollinated styles

测试品种 Cultivars for testing	已知 S 基因型品种 Cultivars with tested S-genotypes	调查的花柱数 No. of pollen grains	长出花粉的花柱 Styles with pollen tubes through their bottoms		从花柱切口长出的花粉管数 No. of pollen tubes protruding from style cuts	平均每根花柱的花粉管数 Average number of pollen tubes per style	推断的 S 基因型 Identified S-genotypes
			花柱数 No.	比率 %			
筑水 Chikusui	清玉 Seigryko(S ₃ S ₄)	35	2	5.7 ± 1.6	3	0.09 ± 0.00	S ₃ S ₄
	幸水 Kohsui(S ₄ S ₅)	33	22	66.7 ± 5.1	118	3.58 ± 0.59	
	长十郎 Chojuro(S ₂ S ₃)	32	25	78.1 ± 6.2	129	4.03 ± 0.76	
喜水 Kisui	幸水 Kohsui(S ₄ S ₅)	34	0	0	0	0	S ₄ S ₅
	菊水 Kikusui(S ₂ S ₄)	28	24	85.7 ± 6.7	197	7.04 ± 1.12	
	丰水 Holsui(S ₃ S ₅)	28	24	85.7 ± 4.5	73	2.61 ± 0.57	
爱甘水 Aikansui	幸水 Kohsui(S ₄ S ₅)	32	0	0	0	0	S ₄ S ₅
	丰水 Holsui(S ₃ S ₅)	29	20	69.1 ± 5.3	164	5.66 ± 0.53	
	长十郎 Chojuro(S ₂ S ₃)	29	22	75.8 ± 6.2	114	3.93 ± 0.82	

参考文献:

- 1 寺見廣雄, 島瀧博高, 島津裕吉. 日本梨各品種の不稔性因子の分析. 園芸学会研究集録. 1946, 3: 367 ~ 371
- 2 平塚伸, 中島正揮, 八神曉彦, 等. ニホンナシ ‘長寿’、‘君冢早生’、‘明月’および‘市原早生’の自家不亲和性遺伝子型の再考. 園芸学会雑誌, 2001, 70 (3): 328 ~ 332
- 3 Zhang S L, Hiratsuka S. Variations in S-protein levels in styles of Japanese pears and the expression of Self-incompatibility. J. Japan Soc. Hort. Sci., 1999, 68 (5): 911 ~ 918
- 4 张绍铃, 平塚伸. 梨花柱 S 糖蛋白对离体花粉萌发及花粉管生长的影响. 园艺学报, 2000, 27 (4): 251 ~ 256
- 5 张绍铃, 杨纪斌, 李秀根, 等. 梨自交不亲和强度不同品种花柱 S 糖蛋白含量的差异. 园艺学报, 2002, 29 (2): 165 ~ 167

Semi Vitro Culture of Pear Style and Identification of the Genotypes of Pear Self-incompatibility

Zhang Shaoling¹, Zhou Jiantao¹, Xu Yiliu¹, Chen Dixin¹, Xu Guohua, and Wu Guifa²

(¹ College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² Gaoyou Orchard, Gaoyou 225600, China)

Abstract: The results of semi vitro culturing pollinated styles excised from plants indicated that the amount of pollen tubes from style bottoms and the percentage of styles with pollen tubes through their bottoms in all tested styles differed with the cross combinations including the incompatible combination and compatible combination. For the former ones, the percentage ranged from 0 to 32.4%, most of which were under 16%, while for the latter ones, the percentage ranged from 51.6% to 86.7% that was close to the rate of field fruit setting after cross-pollination. Furthermore, when the pollen germination rate was above 20%, there was no significant difference between the flowers from the room water cultured flowering woods and field orchards as for the percentage of styles with pollen tubes through their bottoms in all styles. So we can extend the time span of collecting materials for our experiments. For the first time, the method of semi vitro culturing pollinated pear styles including cross compatible and cross incompatible was reported. We have also identified the genotypes of pear cultivars Chikusui, Kisui and Aikansui, namely S_3S_4 , S_4S_5 and S_4S_5 , respectively.

Key words: Pear; Cross-incompatibility; Cross-compatibility; Semi vitro culture; Genotype

番茄抗青枯病新资源材料 AS52

汪国平¹ 黎振兴² 林明宝¹

(¹ 华南农业大学园艺学院, 广州 510642; ² 广东省农业科学院蔬菜研究所, 广州 510640)

A New Tomato Germplasm Resistance to *Ralstonia solanacearum*—‘AS52’

Wang Guoping¹, Li Zhenxing², and Lin Mingbao¹ (¹ College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ² Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China)

关键词: 番茄; 抗青枯病; 资源

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0706-01

广东省农业科学院近年的研究发现, 广东省生产上主要栽培的抗青枯病番茄品种对广东省增城市番茄青枯菌株系 ZC-1 都不具有抗性。该菌株系是一个潜在危害, 若其演变为优势株系, 必将给长江以南各番茄产区生产造成巨大损失。为提早防范, 我们进行了抗源筛选工作, 经多季鉴定发现材料 AS52 对该菌株系具有较高的抗性。

2002 年秋于广东省农业科学院大丰基地对广东 3 个主栽抗病品种‘新星 101’ (115 株)、‘粤星’ (119 株)、‘红星’ (97 株) 及抗病品系‘AS52’ (80 株)、感病品系‘259’ (55 株)、‘AS52’ × ‘259’ F_1 (75 株) 的七八片真叶幼苗用蘸根接种法进行抗性鉴定 (青枯菌浓度为 10^8 cfu/mL)。接种用青枯菌为 ZC-1-1 (ZC-1 的单菌落, 小种 1 强致病力株系) 及 SSJ-3 (来自广东三水, 小种 1 中等致病力株系, 广东优势菌系类型) 的单菌落混合培养而成。植后 30 d 病情基本稳定, 35 d 时调查数据。

6 个基因型的发病率及病情指数分别为: ‘新星 101’ 60.9%、43.1; ‘粤星’ 80.7%、62.2; ‘红星’ 78.4%、60.0; ‘AS52’ 35.7%、29.0; ‘259’ 96.4%、91.3; F_1 85.7%、82.9。3 个抗病品种经多季中等致病力株系接种鉴定为抗病 (各年发病率分别为, 1995 年春‘粤星’ 26.6%, 1997 年秋‘新星 101’ 18.1%、‘粤星’ 21.0%, 2000 年秋‘新星 101’ 5.3%, 2002 年春‘新星 101’ 7.8%、‘粤星’ 4.7%、‘红星’ 6.3%), 在实际生产中这 3 个品种均表现为高抗, 因此其在本研究中的感病表现可以判断是由 ZC-1-1 菌系所致, 而‘AS52’对混合菌系接种表现为抗病, 说明其抗性谱较广, 是一个优良的抗源材料, 由上述数据可以看出杂种 F_1 具偏感表现, 据此推断抗性为隐性。

收稿日期: 2003-10-10; 修回日期: 2003-11-21